บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

(Methods)

1. การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เลี้ยงในห้องทดลองของแผนกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อยู่ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซนติเกรด ให้ได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (ตั้งแต่ 06.00 น. – 20.00 น.) และมืด 10 ชั่วโมง (ตั้งแต่ 20.00น. – 06.00 น.) โดยใช้สวิทช์อัตโนมัติ, กินอาหารมาตรฐานซึ่งสั่งจาก บริษัท F.E. Zuellig (Gold Coil Mills) และมีน้ำประปาให้กินตลอดเวลา เลือกใช้แต่เฉพาะหนูตัวเมียที่ไม่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาก่อนและเติบโตเต็มที่แล้ว อายุ 60 วัน ขึ้นไป มีน้ำหนักประมาณ 150 – 180 กรัม หนูทดลองทุกตัวจะต้องผ่านการตรวจว่ามี – วงสืบพันธุ์ (estrous cycle) เป็นปรกติ (4 – 5 วัน) ไม่น้อยกว่า 3 วง ติดต่อกัน ก่อนที่จะนำมาทดลอง

2. การตรวจวงสืบพันธุ์ของหนูทดลอง

หนูที่ใช้ทดลอง ต้องได้รับการตรวจวงสืบพันธุ์ทุกวัน ซึ่งระยะต่างๆ ของวงสืบพันธุ์ กำหนดจากลักษณะของ เซลล์ที่ปรากฏใน vaginal smear (Long & Evans, 1922) ทำได้โดยใช้แท่งแก้วปลายมนแตะ จุ่มน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 % แตะที่ผนังด้านใน ของช่องคลอดของหนูทดลอง แล้วป้ายลงบนสไลด์ที่สะอาด นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ ทันทีจะเห็นเซลล์รูปร่างต่างๆ เปลี่ยนไปตามระยะของวงสืบพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะคือ

1. Proestrus เป็นระยะก่อนที่จะมีการตกไข่ กินเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ระยะนี้ภายในรังไข่จะมี follicles เติบโตจนถึงขั้น preovulatory swelling มีการสร้างฮอร์โมน estrogen สูง เป็นผลให้มดลูกเกิดพองน้ำ (edema) และมีเส้นเลือดไปหล่อเลี้ยงสูง ที่ผนังของช่องคลอดจะเกิดมีการแบ่งตัวของ epithelial cells ทำให้มีความหนาเพิ่มขึ้น การทำ vaginal smear จะพบเซลล์กลมขนาดกลาง มีนิวเคลียสเห็นชัดเจน

เรียกว่า nucleated cells และไม่พบเซลเม็ดเลือดขาวเลย ในตอนท้ายของระยะนี้หนูจะมี heat พร้อมที่จะผสมกับหนูตัวผู้ได้

2. Estrus เป็นระยะต่อจาก proestrus กินเวลา 9 – 15 ชั่วโมง ตอนต้นของระยะนี้ฮอร์โมน estrogen ที่สร้างจะอยู่ในระดับสูงสุด จากนี้จะมีการตกไข่เกิดขึ้น หลังตกไข่ระดับฮอร์โมน estrogen จะลดลง มดลูกจะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากสูญเสียน้ำ ผนังของช่องคลอดยังคงหนาและเกิด cornification มีส่วนของเซลหลุดออกมาอยู่ใน lumen มาก ลักษณะเป็นเซลขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน ไม่มีนิวเคลียส เรียกว่า cornified cells สามารถพบได้ใน vaginal smear ตอนระยะต้นๆ แต่ตอนใกล้จะสิ้นสุดของระยะนี้จะเริ่มมีเซลเม็ดเลือดขาวเข้ามาปะปนด้วยเล็กน้อย

3. Metestrus เป็นระยะสั้นๆ เกิดขึ้นหลังจากการตกไข่แล้ว กินเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เป็นระยะที่ระดับฮอร์โมน estrogen ในเลือดลดต่ำลงมาก ในรังไข่จะพบ corpora lutea ที่เกิดจากการตกไข่ครั้งล่าสุดและ follicles เล็กๆ จำนวนมาก ส่วนมดลูกจะมีขนาดเล็กและใน vaginal smear จะเริ่มมีเซลเม็ดเลือดขาวปนกับ cornified cells มากขึ้น

4. Diestrus เป็นระยะที่นานที่สุดของวงสืบพันธุ์ กินเวลาประมาณ 60 – 70 ชั่วโมง ระยะนี้รังไข่ไม่มีการสร้างฮอร์โมน estrogen เลย, corpora lutea เริ่มสลายตัว มดลูกมีขนาดเล็ก, epithelial cells ของช่องคลอดบางกว่าระยะอื่น ใน vaginal smear จะพบเซลเม็ดเลือดขาวเป็นส่วนใหญ่

3. การชักนำให้หนูเกิดท้องเทียมและเกิด Decidualization

3.1 การชักนำให้เกิดท้องเทียม (Pseudopregnancy)

ทำหนูให้เกิดท้องเทียม โดยกระตุ้นบริเวณปากมดลูก (cervix) ด้วยกระแสไฟฟ้าในตอนเช้าของระยะ proestrus (เวลา 10.00 – 12.00 น.) และ estrus (เวลา 10.00 – 12.00 น.) ตามวิธีของ Shelesnyak (1931) โดยใช้ไฟฟ้าที่มีความต่างศักดา 100 โวลต์ ความถี่ 32 ครั้งต่อวินาที กระตุ้น 2 ครั้งๆ ละ 5 วินาที

เว้นช่วงระหว่างการกระตุ้น 3 วันที่ รุ่งขึ้นทำ vaginal smear ดู วันแรกที่พบเซล เม็ดเลือดขาวใน vaginal smear นับเป็นวันที่ 1 (L_1) ของทองเทียมและวันต่อไป เป็น L_2, L_3,.....ตามลำดับ

3.2 การทำให้เกิด Decidualization

ใช้หนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมแล้ว เช้าวันที่พบเซลเม็ดเลือดขาวเป็นวันที่ 4 ใน vaginal smear เวลาประมาณ 10.00 – 12.00 น. นำมาทำให้สลบด้วยether ใช้ dettol 2.5% ทาบริเวณท้องด้านล่างเหนือช่องคลอดเล็กน้อยใช้กรรไกรตัดหนังและกล้ามเนื้อ ตอนกึ่งกลางของลำตัว (mid-ventral line) ให้เปิดออกเป็นช่องยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ปากคีบปลายโค้ง คีงไขมันรอบๆ มดลูกขึ้นมา ส่วนของมดลูกจะติดขึ้นมาด้วย ดึงมดลูกออกมาจนเห็นส่วนที่ต่อระหว่างมดลูกกับท่อนำไข่ ใช้เข็มปลายแหลมยาวประมาณ 2 นิ้ว สอดเข้าไปในปากมดลูก (cervix) และดันเข็มจนถึงรอยต่อของมดลูกกับท่อนำไข่ แล้วค่อยๆ ดึงเข็มออกมาโดยให้ปลายเข็มครูดกับผนังมดลูกทางด้าน antimesometrium จนตลอดความยาวของมดลูก ทำเหมือนกันทั้งสองข้าง เสร็จแล้วนำส่วนต่างๆ ที่ดึงออกมากลับเข้าลำตัวตามเดิม ใช้ไหมเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกัน แล้วจึงเย็บหนังชั้นนอกอีกครั้งด้วย skin clips

4. การเตรียมฮอร์โมนและสารทดลองสำหรับใส่หลอดแก้วฝังสมองหนูและสำหรับฉีดทดลอง

4.1 การเตรียม Lyophilized Pineal Tissue จากลิง

ใช้ลิงหางยาวชนิด Macaca fascicularis ซึ่งซื้อมาจากฟาร์มสุพินและฟาร์ม Friendship นำมาฆ่าให้ตายด้วยการฉีด overdose ของ barbital sodium เจาะช่องท้อง แล้วแกะเอาต่อมไพเนียลออกในทันทีที่ตาย รวบรวมไว้ประมาณ 20 ต่อม โดยแช่ไว้ในภูแข็ง แล้วนำไปดูดน้ำออกจากเนื้อเยื่อจนแห้งด้วย lyophilizer ในอุณหภูมิที่เย็นจัด (dryice ใน cold acetone) เมื่อแห้งดีแล้วนำมาใส่โกร่งบดให้ละเอียดเป็นผง แล้วเก็บใส่ขวด เอาไว้ใน desiccator

4.2 การเตรียม Melatonin สำหรับฉีดทดลอง

ชั่ง Melatonin ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายใน 95% ethyl alcohol 1 ส่วน แล้วเติมน้ำเกลือ 0.85% 9 ส่วน (Ota & Hsieh, 1968), ทำให้มีความเข้มข้น 1 และ 2 ไมโครกรัม ต่อ 5 ไมโครลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้

4.3 การเตรียม Serotonin สำหรับฉีดทดลอง

ชั่ง Serotonin creatinine sulfate complex ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งอ่านได้ละเอียดถึง 1/10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำเกลือ 0.85% ทำให้มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม ต่อ 5 ไมโครลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซนติเกรด ตลอดเวลาที่ใช้

5. การเตรียมหลอดแก้ว Capillary สำหรับบรรจุสารที่ใช้ฝังในเนื้อเยื่อของสมอง และต่อมใต้สมอง

ใช้หลอดแก้วกลวงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร นำส่วนกลางไปลนไฟจากเตาแกสขนาดเล็ก (camping gas) โดยใช้มือจับปลาย 2 ข้าง เมื่อแก้วเริ่มอ่อนตัว ค่อยๆ ดึงออกตรงๆ จนได้ขนาดที่ต้องการ ทิ้งให้เย็นแล้วใช้ตะไบสามเหลี่ยมตัดออกเป็นท่อนๆ ยาวประมาณ 6 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อโรคโดยใส่ในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซนติเกรด

6. การบรรจุสารทดลองเข้าหลอดแก้ว

นำหลอดแก้ว capillary ที่เตรียมในข้อ 5 จิ้มปลายข้างหนึ่งลงในสารที่จะใช้ทดลองซึ่งบดละเอียดดีแล้ว กดให้แน่น หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งสารที่ใช้ทดลองบรรจุอยู่แน่นที่ปลายหลอดและสูงขึ้นมาจากปลายประมาณ 3 – 5 มิลลิเมตร ซึ่งจะหนักประมาณ 80 – 100 ไมโครกรัม (Varavudhi & Chobsieng, 1972) ดังแสดงในรูปที่ 1a

7. การบรรจุสารทดลองเข้าหลอด Polyethylene เพื่อฝังในเยื่อหุ้มรังไข่

ใช้สารทดลองซึ่งบดละเอียดแล้วผสมกับเนยเหลวบริสุทธิ์ (pure butter) ในอัตราส่วน 50 : 1 โดยน้ำหนัก นำไปใส่ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซนติเกรด สักครู่เพื่อให้เนยแข็งขึ้น แล้วใช้หลอก polyethylene ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางข้างใน 0.023 นิ้ว และข้างนอก 0.038 นิ้ว ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร จิ้มปลายหลอดข้างหนึ่งลงในสารที่ผสมกับเนยแล้ว กดหลายๆ ครั้งให้สารเข้ามาในหลอกจนกระทั่งส่วนผสมของสารทดลองและเนยบรรจุสูงจากปลายหลอดประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วใช้กรรไกรตัดหลอดให้เป็นท่อนๆ ท่อนหนึ่งยาว 2 มิลลิเมตร ซึ่งจะมีสารทดลองบรรจุอยู่หนักประมาณ 40 – 50 ไมโครกรัม

8. การฝังหลอก Polyethylene ในเยื่อหุ้มรังไข่

ใช้กรรไกรตัดหนังและกล้ามเนื้อบริเวณด้านข้างลำตัวใต้ซี่โครงซี่สุดท้ายให้เปิดเป็นช่องยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ปากคีบปลายโค้งดึงไขมันรอบๆ รังไข่ขึ้นมา ส่วนของรังไข่จะติดขึ้นมาด้วย ใช้กรรไกรปลายแหลมตัดเยื่อหุ้มรังไข่ให้เป็นช่องเล็กน้อย แล้วคีบหลอก polyethylene ที่เตรียมไว้ในข้อ 7 สอดเข้าไปในเยื่อหุ้มนี้พยายามดันให้เข้าไปลึกๆ เสร็จแล้วนำส่วนของรังไข่เก็บเข้าลำตัวตามเดิม เย็บชั้นของกล้ามเนื้อและหนังให้เรียบร้อย ทำเช่นนี้เหมือนกันทั้ง 2 ข้าง (แผนภาพที่ 2)

9. การฝังหลอดแก้ว Capillary ใน Hypothalamus บริเวณ Median Eminence

นำหนูมาทำให้สลบโดยให้ดม ether แล้วใช้กรรไกรปลายแหลมตัดขนออกตรงส่วนที่ติดกับลำตัว ให้ขาดออกจากกันเล็กน้อยเพื่อให้เห็น external auditory meatus ได้ชัด ใช้ ear clips สอดเข้าไปในช่อง external meatus นี้ทั้งสองข้าง แล้วนำหนูเข้าเครื่อง stereotaxic โดยให้นอนคว่ำ ช่องของ ear clip ยึดติดกับ ear bar (J) ทั้งสองข้าง (แผนภาพที่ 2) ส่วนฟันหน้าซี่บนวางอยู่บน palate bar (I) ซึ่งจะอยู่เหนือระดับ interaural line 5 มิลลิเมตร ใส่ nose clamp (K) บนจมูกของหนูเพื่อกันไม่ให้ส่วนหัวเคลื่อนที่เวลาหนูดิ้น ใช้สำลีชุบ ether ให้ดมตลอดเวลาที่ทำ

001964

ใช้ 70% ethyl alcohol เช็ดฆ่าเชื้อโรคบริเวณหัวส่วนบน แล้วใช้กรรไกรตัดหนังตรงกลาง ศีรษะยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้คลิปเล็กๆ หนีบหนังดึงมาไว้ด้านข้าง ใช้เข็มปลายแหลมโค้งเขี่ยพังผืดบนกระโหลกออกให้หมด จะแลเห็น bregma (รอยต่อของกระดูก frontal และparietal) (รูปที่ 1 b,c) ใช้คีมสอดจุดให้เห็นชัด แล้วใช้สว่านเจาะกระโหลกขนาดเล็กกรอกระโหลกบริเวณเยื้องกับที่จะเจาะ 2 ข้าง สำหรับขันสกรูยึดหลอดแก้ว แล้วจึงเจาะตรง bregma ให้ทะลุ ใช้สำลีชุบ alcohol เช็ดฆ่าเชื้อโรค แล้วจึงฝังหลอดแก้วเปล่าหรือที่บรรจุสารที่ต้องการศึกษาลงไป จนกระทั่งปลายหลอดอยู่เหนือ interaural line 1.4 มิลลิเมตร แล้วใช้สำลีแตะผง tetracycline ทาบริเวณกระโหลกรอบๆ หลอดที่ฝังเพื่อกันเชื้อโรค หลังจากนั้นละลาย dental cement ให้เหลวกำลังดี แล้วยาลงบนกระโหลก โดยพยายามปิดแผลให้หมด เมื่อ dental cement แข็งตัวก็จะยึดหลอดให้ติดกับสกรูบนกระโหลก (รูปที่ 1 d)

10. <u>การฝังหลอดแก้ว Capillary ลงในต่อมใต้สมองส่วนหน้า</u>

นำหนูมาเข้าเครื่อง stereotaxic ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว แต่ตำแหน่งที่ฝังหลอดนับจาก bregma มาทางด้านหลัง 1.6 มิลลิเมตร และเยื้องไปทางซ้ายจาก midline 0.9 มิลลิเมตร ฝังให้ปลายหลอดอยู่เหนือ interaural line 0.4 มิลลิเมตร

11. <u>การฝังหลอด Polyethylene ลงใน Lateral Ventricle</u>

นำหนูมาเข้าเครื่อง stereotaxic ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว แต่ตำแหน่งที่จะเจาะอยู่ห่างจาก bregma ไปทางซ้ายหรือขวา 1.4 มิลลิเมตร ใช้หลอด polyethylene number P.E. 50 ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ฝังลงไปลึก 3 มิลลิเมตร จากเยื่อหุ้มสมอง (dura matter)

12. <u>การฉีดยาเข้าใน Lateral Ventricle</u>

หลังจากฝังหลอดลงใน lateral ventricle แล้ว ทิ้งให้ dental cement แข็งเสียก่อนแล้วใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 หรือ 25 ไมโครลิตร ดูดสารที่ต้องการจะฉีดแล้วสอดเข็มลงไปในหลอดที่ฝังให้ปลายเข็มอยู่พอดีกับปลายหลอดที่ฝังอยู่ ค่อยๆ ปล่อยน้ำยา

ลงไป ภายในเวลาประมาณ 1 นาที ต่อน้ำยา 5 ไมโครลิตร ซึ่งการฉีดนี้ทำตามแนวที่เคยฉีดสีพวก Evan blue เข้าไป และสีนี้จะไปสะสมที่บริเวณ hypothalamus โดยเฉพาะที่ median eminence เมื่อเสร็จแล้วเชื่อมปลายหลอดด้วยความร้อนจากหัวแร้งไฟฟ้าขนาดเล็ก เมื่อจะฉีดยาครั้งต่อไป ก็ใช้กรรไกรตัดส่วนปลายหลอดออกก่อน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้หลอดแก้ว capillary ซึ่งใช้ฝังใน ME หรือ AP ได้ เพราะต้องเชื่อมปลายหลอดให้ติดกันและตัดออกทุกครั้งที่ฉีดยาใหม่

13. การ Autopsy

การฆ่าหนู ใช้วิธีให้ดม ether แล้วเปิดหน้าท้องออกเป็นช่องกว้าง ตัดส่วนของมดลูกและรังไข่มาชั่งน้ำหนักแล้วจดไว้ นำรังไข่มา fix ใน Kahle's AFA เพื่อทำสไลด์ ศึกษาลักษณะของ follicles และ corpora lutea ต่อไป ใช้กรรไกรตัดคอและกรามล่างออก เหลือแต่หัวส่วนบน นำมาแช่ในน้ำยา formalin 10% เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้ส่วนของสมองแข็ง เมื่อสมองแข็งดีแล้วแกะผิวกระโหลกส่วนบนออกตรวจดูบริเวณที่ฝังหลอด ถ้าเห็นปลายหลอดอยู่ตรงตำแหน่งที่ต้องการฝัง จึงจะรวมไว้ในการทดลอง

14. การทำ Paraffin section ของรังไข่ เพื่อดูลักษณะของ Follicles และ Corpora lutea

14.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

14.1.1 Ehrlich's acid haematoxylin ชั่ง haematoxylin 8 กรัม ใส่ใน 95% ethyl alcohol (หรือ absolute alcohol) 400 มิลลิลิตร อุ่นบน water bath จนละลายเข้ากันดีแล้วชั่ง potash alum 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 นี้มาผสมกัน เติม glycerine 400 มิลลิลิตร, glacial acetic acid 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ใส่ขวดอุดด้วยสำลีหลายๆ ชั้นทิ้งไว้ให้ถูกแสงแดดประมาณ 6 อาทิตย์ (ถ้าต้องการให้สุกรวดเร็วให้ใช้ได้ทันที ก็เติม potassium permanganate 0.4 กรัม ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร)

14.1.2 0.5% Eosin in alcohol ชั่ง eosin Y. 0.5 กรัม ละลายด้วย 95% ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร

14.2 การทำสไลด์

นำรังไข่ซึ่ง fixed ไว้ใน Kahle's AFA ประมาณ 48 ชั่วโมงแล้ว มาแช่ใน 70% ethyl alcohol ประมาณ 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไป dehydrate โดยเปลี่ยนแช่ใน 80% ethyl alcohol, 90% alcohol, 95% alcohol, 95% alcohol + n-butyl และ n-butyl alcohol ตามลำดับ ขั้นละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน xylol อีก 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้ tissue ใส ต่อจากนั้นนำไปแช่ในส่วนผสมของ xylol และ paraplast อย่างละเท่าๆ กัน ในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 30 นาที เปลี่ยน paraplast 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง ในตู้อบเช่นกัน แล้วนำมา embed ใน paraplast หลังจากทิ้งให้แข็งดีแล้ว ตัด section หนา 8 ไมครอน นำมาติดบนสไลด์ด้วย egg albumin แล้วนำไปย้อมสี Ehrlich's acid haematoxylin และ eosin ตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ เพื่อศึกษาลักษณะของ follicles และ corpora lutea ต่อไป

15. การทำ Frozen section ของสมอง เพื่อดูลักษณะของเซลและบริเวณที่ฝังหลอดทดลอง

15.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

15.1.1 Albrecht's alcoholic gelatine (Albrecht, 1954) ชั่งผง gelatin 1.5 กรัม ละลายในน้ำอุ่น (50 – 55 องศาเซนติเกรด) 120 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ โรยผง gelatin ลงไป คนให้เข้ากันประมาณ 10 นาที จนละลายดีแล้ว จึงเติม absolute alcohol 80 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้าๆ คนให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

15.1.2 0.5% Cresyl Violet

ชั่ง cresyl violet 0.5 กรัม ละลายด้วย น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution เมื่อจะใช้จึงกรองและเติม glacial acetic acid

(dilute 1:10) 4 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร

15.2 การตัดและติด sections บนสไลด์

นำส่วนของสมองที่ต้องการตัด section ซึ่ง fix ใน10% formalin แล้วมาติดบนแป้นเหล็ก (สำหรับใช้กับเครื่อง Cryostat, IEC โดยเฉพาะ) ด้วยน้ำยา cryoform แล้วทำให้เย็นจัด โดยใส่ในเครื่อง cryostat ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ –20 องศาเซนติเกรดทันที ทิ้งไว้ในเครื่องนี้ 1 คืน เพื่อให้ tissue แข็งและเย็นจัดทั่วกันหมด แล้วทำการตัด sections หนา 24 ไมครอน ตัดแล้วนำแต่ละ section ไปใส่ใน Albrecht's alcoholic gelatine อย่างน้อย 5 นาที แล้วใช้ภู่กันขนอ่อนช้อนขึ้นมาวางบนสไลด์ ปล่อยให้ระเหยจนเกือบแห้ง ใช้กระดาษซับ ซับรอบๆ tissue เมื่อแห้งดีแล้ว นำทั้งสไลด์แช่ใน 95% ethyl alcohol. Section จะติดแน่นกับสไลด์ด้วย gelatin ที่เหลืออยู่ หลังจากนั้นนำมา hydrate ต่อจนถึงน้ำ แล้วนำไปย้อมสี cresyl violet ต่อไป

15.3 การย้อมสี Cresyl Violet เพื่อดูลักษณะของเซลและบริเวณที่ฝังหลอดทดลอง (Fernstrom, 1958)

นำ sections ที่ติดอยู่บนสไลด์ แช่ใน 0.5% cresyl violet (3 – 10 นาที) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นใส่ใน 70% ethyl alcohol เพื่อให้สีหลุดจากเนื้อเยื่อไปบ้าง แล้วผ่าน 95% ethyl alcohol อย่างรวดเร็ว จากนั้นแช่ใน chloroform อย่างน้อย 20 นาที, differentiate ใน 95% ethyl alcohol จนได้สีที่ต้องการ, dehydrate ใน n-butyl alcohol 2 ครั้ง, clear ใน xylol และ mount ด้วย permount.

แผนภาพที่ 2

แสดงส่วนต่างๆ ของเครื่อง Stereotaxic number 51400 M.

ตัวอักษรอธิบายภาพ

A = ที่สำหรับจับหลอดแก้วที่จะฝัง

B, C = angular adjustments

D = scale สำหรับหมุนไปข้างหน้าหรือข้างหลัง

E = scale สำหรับหมุนไปข้างซ้ายหรือข้างขวา

F = scale สำหรับหมุนขึ้นหรือลง

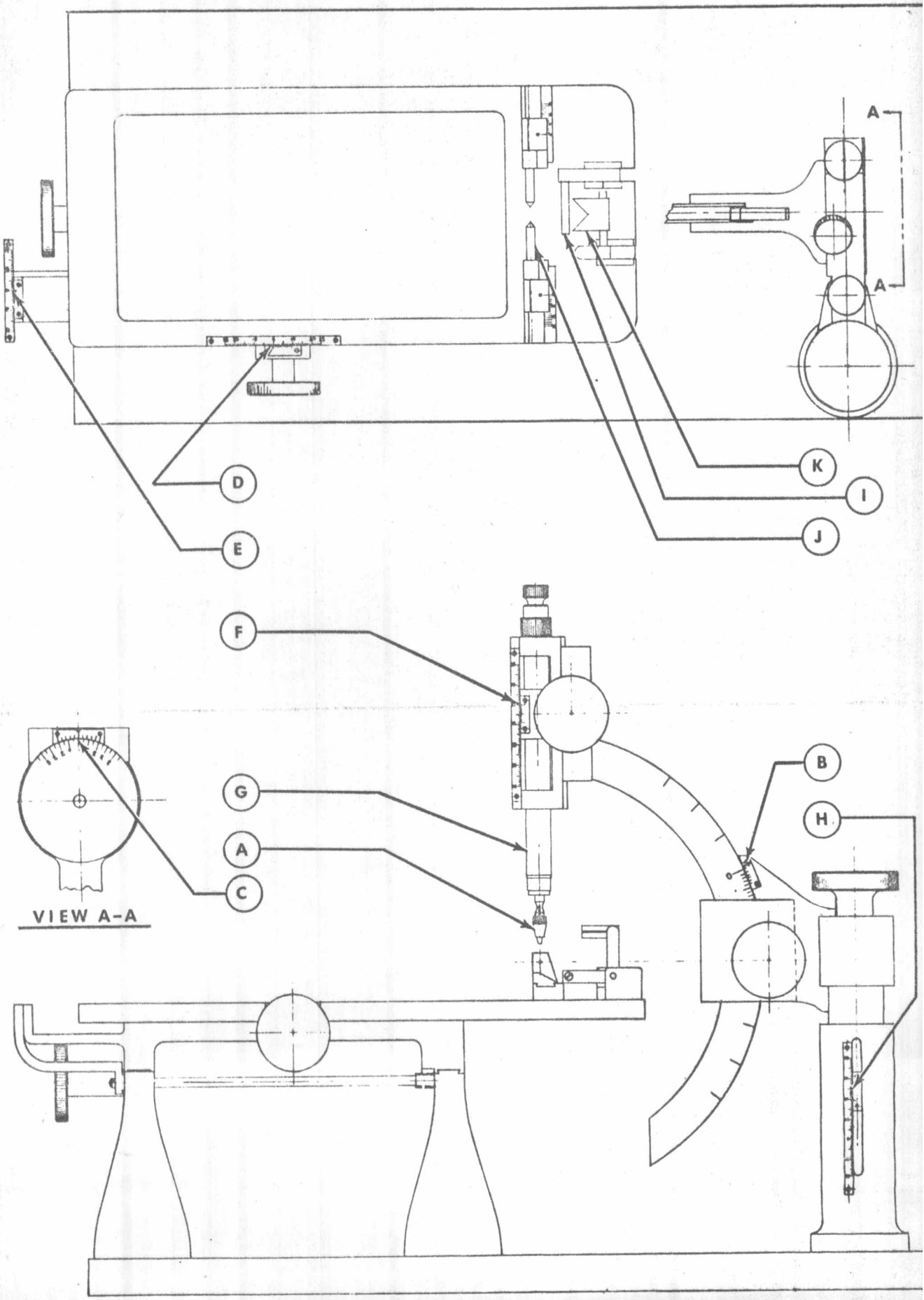
G = electrode barrel

H = post vertical scale

I = palate bar

J = ear bar

K = nose clamp


A
A
D
E
K
I
J
F
G
A
C
B
H
VIEW A-A

แผนภาพที่ 1

รูปที่ 1 a แสดงหลอดแก้ว (capillary tube) ที่ใช้สำหรับฝังสมองหนู, 3 หลอดบนเป็นหลอดเปล่า, 3 หลอดล่างบรรจุสารทดลองที่ต้องการฝัง ยาวประมาณ 3 – 5 มิลลิเมตร (รอยที่ขีดไว้เป็นความยาวของสารที่บรรจุในหลอด)

รูปที่ 1 b แสดงให้เห็นตัวหนูขณะอยู่ในเครื่อง stereotaxic เปิดหนังส่วนหัวออก สามารถเห็น bregma ได้ชัดเจน

รูปที่ 1 c ขยายให้เห็นส่วนของ bregma และบริเวณที่จะทำการฝังหลอดทดลอง

รูปที่ 1 d แสดงบริเวณที่ฝังหลอด และยาด้วย dental cement แล้ว เห็นสกรูอยู่ 2 ข้าง สำหรับยึดหลอดแก้วซึ่งอยู่ตรงกลาง

กำลังขยาย

รูป 1 a x 3

รูป 1 c x 3

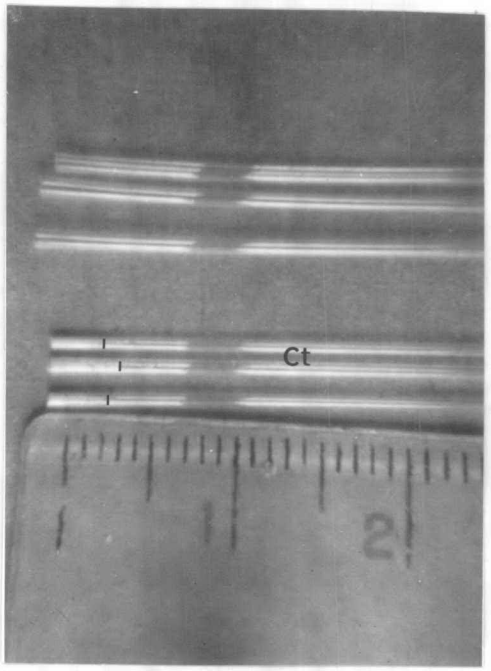
รูป 1 d x 3

อักษรย่ออธิบายภาพ

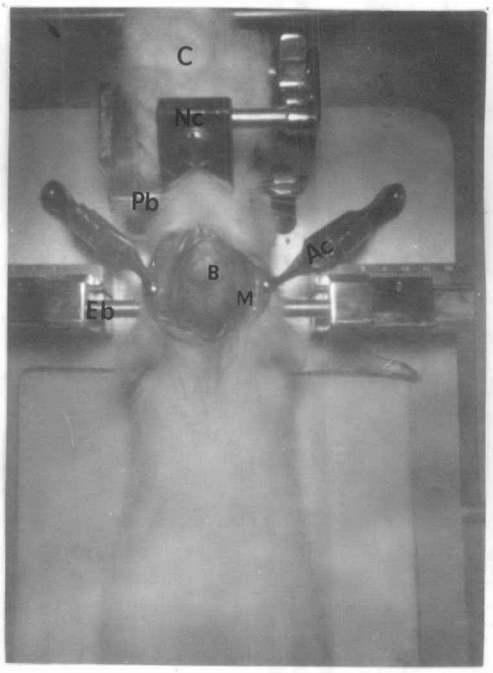
Ac = Arterial clip
B = Bregma
C = Cotton wool
Ct = Capillary tube
Dc = Dental cement
Eb = Ear bar
It = Implanted tube
M = Muscle
Nc = Nose clamp
Pb = Palate bar
S = Screw

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1

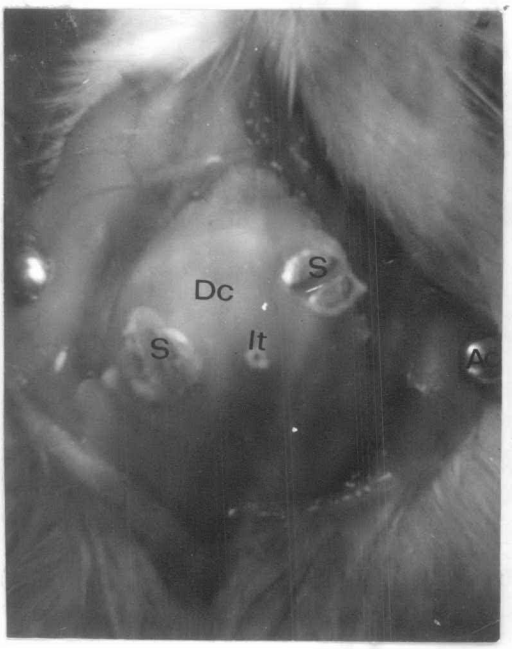


รูปที่ 1a



รูปที่ 1b

รูปที่ 1c



รูปที่ 1d

แผ่นภาพที่ 2

รูปที่ 2 แสดงหลอด polyethylene ยาวประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร ซึ่งฝังอยู่ในเยื่อหุ้ม (capsule) ของรังไข่

กำลังขยาย x 3

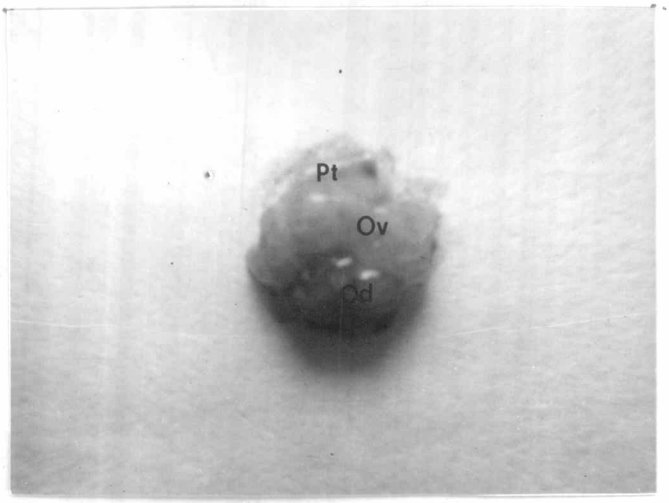
อักษรย่ออธิบายภาพ

Pt = Polyethylene tube

Od = Oviduct

Ov = Ovary

แผนภาพที่ 2



รูปที่ 2

การทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้หนูเพศเมียรวมทั้งสิ้น 187 ตัว และแบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มย่อย ดังนี้

1. ศึกษาผลของการฝังMelatonin, Serotonin และเนื้อเยื่อต่อมไพเนียลลิงที่ถูกดูดน้ำออก (Lyophilized pineal tissue) ใน Median Eminence (ME) หรือ Adenohypophysis (AP) ที่มีต่อการชักนำให้เกิด Deciduoma ในหนูที่ทำให้เกิดท้องเทียมโดยกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

ใช้หนูทั้งหมด 57 ตัว และแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1. Empty tube control

a) ฝังหลอดเปล่าในสมองส่วน ME ใช้หนู 5 ตัว

b) ฝังหลอดเปล่าใน AP ใช้หนู 5 ตัว

กลุ่มที่ 2. Melatonin implant

a) ฝังหลอดแก้วบรรจุ melatonin ในสมองส่วน ME ใช้หนู 6 ตัว

b) ฝังหลอดแก้วบรรจุ melatonin ใน AP ใช้หนู 11 ตัว

กลุ่มที่ 3. Serotonin implant

a) ฝังหลอดแก้วบรรจุ serotonin ในสมองส่วน ME ใช้หนู 6 ตัว

b) ฝังหลอดแก้วบรรจุ serotonin ใน AP ใช้หนู 8 ตัว

กลุ่มที่ 4. Lyophilized pineal tissue implant

a) ฝังหลอดแก้วบรรจุ lyophilized pineal tissue ใน ME ใช้หนู 6 ตัว

b) ฝังหลอดแก้วบรรจุ lyophilized pineal tissue ใน AP ใช้หนู 10 ตัว

หนูทดลองถูกกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมในตอนเช้าของวัน proestrus และ estrus ตอนบ่ายของวัน L_0 ฝังหลอดเปล่าหรือหลอดบรรจุสารที่ใช้ทดลองในสมองส่วน ME หรือใน AP แล้วทำ vaginal smear ตรวจดู cycle ทุกวัน เช้าของวัน L_4 (เวลา 10.00 – 12.00 น.) ทำ trauma มดลูกทั้ง 2 ข้าง เช้าของวัน L_9 ฆ่า แล้วผ่าหน้าท้อง ตรวจดูบริเวณของมดลูกที่ response แล้วแบ่ง grade ของการ response ตามวิธีของ Shelesnyak and Kraicer (1961) ซึ่งดูจากความยาวของมดลูกส่วนที่เกิด deciduoma ดังนี้

grade 0 = ไม่เกิด deciduoma เลย

grade 1 = เกิด deciduoma ไม่เกิน 1/4 ของมดลูกแต่ละข้าง

grade 2 = เกิด deciduoma มากกว่า 1/4 แต่น้อยกว่า 3/4 ของแต่ละข้าง

grade 3 = เกิด deciduoma ตั้งแต่ 3/4 ขึ้นไป แต่เกิดไม่ตลอดความยาวของมดลูก

grade 4 = เกิด deciduoma ตลอดความยาวของมดลูกในแต่ละข้าง ลักษณะเป็น sausage

ตัดส่วนของมดลูกและรังไข่ไปชั่งน้ำหนักไว้ นำรังไข่ของพวกที่เกิด deciduoma เต็มที่และพวกที่ไม่เกิด deciduoma เลย พวกละ 2 ตัว ไป fix ในน้ำยา AFA เพื่อตัด sections ทำสไลด์ ดูลักษณะของ follicles และ corpora lutea ต่อไป ส่วนหัวตัดออกแช่ในน้ำยา formalin 10% เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาตรวจดูบริเวณที่ฝังหลอดแก้ว โดยใช้ stereomicroscope ที่มีกำลังขยาย 20 เท่า ตัวที่มีปลายหลอดอยู่ตรงตำแหน่งที่ต้องการฝังเท่านั้น จึงจะรวมไว้ในการทดลอง ตัด section ทำสไลด์ส่วน hypothalamus ของหนูที่มีหลอดฝังตรงบริเวณ ME 2 ตัว เพื่อเป็นตัวอย่างดูบริเวณที่ฝังหลอด

2. <u>ศึกษาผลของการฝัง Melatonin, Serotonin และเนื้อเยื่อของต่อมไพเนียลสิงที่ถูกดูดน้ำออก (Lyophilized pineal tissue) ใน Median Eminence (ME) หรือ Adenohypophysis (AP) ที่มีต่อเวลาการทำงานของ corpora luteaในหนูที่ทำให้เกิดท้องเทียม โดยกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า</u>

ใช้หนูทั้งหมด 50 ตัว และแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1. Unimplanted control

กระตุ้นให้เกิดท้องเทียม ในตอนเช้าของวัน proestrus และ estrus แล้วทำ vaginal smear เพื่อดูเวลาที่เกิดท้องเทียมตามปรกติ ใช้หนู 5 ตัว

กลุ่มที่ 2. Empty tube control

a) ฝังหลอดเปล่าในสมองส่วน ME ใช้หนู 5 ตัว

b) ฝังหลอดเปล่าใน AP ใช้หนู 5 ตัว

กลุ่มที่ 3. Melatonin implant

a) ฝังหลอดแก้วบรรจุ melatonin ในสมองส่วน ME ใช้หนู 6 ตัว

b) ฝังหลอดแก้วบรรจุ melatonin ใน AP ใช้หนู 6 ตัว

กลุ่มที่ 4. Serotonin implant

a) ฝังหลอดแก้วบรรจุ serotonin ในสมองส่วน ME ใช้หนู 6 ตัว

b) ฝังหลอดแก้วบรรจุ serotoiin ใน AP ใช้หนู 5 ตัว

กลุ่มที่ 5. Lyophilized pineal tissue implant

a) ฝังหลอดแก้วบรรจุ lyophilized pineal tissue ใน ME ใช้หนู 6 ตัว

b) ฝังหลอดแก้วบรรจุ lyophilized pineal tissue ใน AP ใช้หนู 6 ตัว

หนูกลุ่มที่ 2–5 ถูกกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมในตอนเช้าของวัน proestrus และ estrus แล้วทำ vaginal smear ตรวจดู cycle ทุกวัน เช้าของวัน L7 ฝังหลอดเปล่าหรือหลอดบรรจุสารทดลอง ในสมองส่วน ME หรือใน AP แล้วตรวจดู cycle ของหนูโดยการทำ vaginal smear ทุกวัน เพื่อดูจำนวนวันที่เกิดท้องเทียม ฆ่าหนูทุกตัวภายหลังที่กลับมามี estrous cycle ใหม่อย่างน้อย 3 cycles แล้วตัดส่วนหัวมาแช่ใน

น้ำยา formalin 10% เป็นเวลา 10 วัน เพื่อตรวจดูบริเวณที่ฝังหลอดแบบเดียวกับการทดลองที่ 1.

3. ศึกษาผลของการฝัง Melatonin, Serotoninและเนื้อเยื่อของต่อมไพเนียลลิงที่ถูกดูดน้ำออก (Lypphilized pineal tissue) ในสมองส่วน Median Eminence (ME) ที่มีต่อการชักนำให้ non-functional corpora lutea เปลี่ยนไปเป็น functional corpora lutea ในระหว่าง estrous cycle ปรกติ

ใช้หนูทั้งหมด 20 ตัว และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ 1. Empty tube control ใช้หนูจำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 2. Melatonin implant ฝังด้วยหลอดแก้วบรรจุ melatonin ใช้หนู 5 ตัว

กลุ่มที่ 3. Serotonin implant ฝังด้วยหลอดแก้วบรรจุ serotonin ใช้หนู 5 ตัว

กลุ่มที่ 4. Lyophilized pineal tissue implant ฝังด้วยหลอดแก้วบรรจุ lyophilized pineal tissue ใช้หนู 5 ตัว

หนูทุกกลุ่มฝังหลอดเปล่าหรือหลอดบรรจุสารทดลอง ในตอนบ่ายของวัน proestrus เวลาประมาณ 13.00 น. แล้วทำ vaginal smear ตรวจดู cycle ทุกวัน จนกระทั่งหนูกลับมามี cycle ใหม่อย่างน้อย 3cycles จึงฆ่า และตัดส่วนหัวมาแช่ในน้ำยา formalin 10% เป็นเวลา 10 วัน เพื่อตรวจดูบริเวณที่ฝังหลอดแบบเดียวกับการทดลองที่ 1.

4. ศึกษาผลของการฉีด Melatonin และSerotonin ใน Lateral Ventricle ที่มีต่อการชักนำให้ non-functional corpora lutea เปลี่ยนไปเป็น functional corpora luteaในระหว่าง Estrous cycle ปรกติ

ใช้หนูทั้งหมด 41 ตัว เลือกเฉพาะหนูที่มี estrous cycle 4 วันสม่ำเสมอไม่ต่ำกว่า 3 cycles มาทดลอง ตอนบ่ายของวัน proestrus นำมาฝังหลอด

polyethylene ใน lateral ventricle ด้านขวา แล้วแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1. Vehicle control ใช้หนูจำนวน 8 ตัว

เป็นกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนใดๆ แต่ฉีด vehicle ของฮอร์โมน คือ 95% ethyl alcohol + physiological saline 1:9 ส่วน เริ่มฉีดเช้าของวัน estrus และฉีดทุกวัน วันละ 3 ครั้ง (เวลา 9.00 น., 13.00 น. และ 17.00 น.) ฉีดครั้งละ 10 ไมโครลิตร แล้วทำ vaginal smear ตรวจดู cycle ของหนูทุกวัน วันแรกที่พบ nucleated cells หรือ cornified cells จึงเลิกฉีด

กลุ่มที่ 2. Melatonin treatment

a) ฉีด melatonin ในวัน estrus และวันแรกของ diestrus ฉีดวันละ 3 ครั้ง เช่นกัน ครั้งละ 2 ไมโครกรัม (10 ไมโครลิตร) ใช้หนู 7 ตัว

b) ฉีด melatonin ทุกวัน ตั้งแต่วัน estrus จนถึง L_5 ฉีดวันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 ไมโครกรัม (10 ไมโครลิตร) ใช้หนู 8 ตัว

c) ฉีดmelatonin ทุกวัน ตั้งแต่วัน estrus จนถึง L_5 ฉีดวันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ไมโครกรัม (10 ไมโครลิตร) ใช้หนู 10 ตัว

กลุ่มที่ 3. Serotonin treatment

ฉีด serotoninทุกวัน ตั้งแต่วัน estrus จนถึง L_5 ฉีดวันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ไมโครกรัม (10 ไมโครลิตร) ใช้หนู 8 ตัว

หนูทุกกลุ่มหลังจากฉีดยาแล้ว ทำ vaginal smear ตรวจดู cycleทุกวัน ฆ่าหนูหลังจากที่กลับมามี estrous cycle ใหม่ ตัดส่วนหัวแช่ในน้ำยา formalin 10% เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาแกะสมองออก ตรวจดูบริเวณที่ฝังหลอดทดลอง ตัวที่มีหลอดอยู่ตรงบริเวณที่ต้องการฝังเท่านั้นจึงจะรวมไว้ในการทดลอง

หมายเหตุ หนูที่ฉีดยาแล้ว ถ้าเกิดท้องเพียงไม่ถึง 5 วัน ก็เลิกฉีดยาได้ เมื่อพบ nucleated cell หรือ cornified cells เป็นวันแรกใน vaginal smear

5. ศึกษาผลของการฝัง Melatonin, Serotonin และเนื้อเยื่อของต่อมไพเนียลลิงที่ถูกกดน้ำออก (Lyophilized pineal tissue) ในเยื่อหุ้มรังไข่ ที่มีต่อหน้าที่การทำงานของรังไข่ ในระหว่าง Estrous cycle ปรกติ

ใช้หนูทั้งหมดจำนวน 19 ตัว และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ 1. Vehicle control ใช้เนยเหลวบริสุทธิ์แทนสารทดลองบรรจุในหลอด polyethylene ใช้หนูจำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 2. Melatonin implant ใช้melatonin ผสมกับเนยเหลวบริสุทธิ์ ใช้หนูจำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3. Lyophilized pineal tissue implant ใช้ lyophilized pineal tissue ผสมกับเนยเหลวบริสุทธิ์ ใช้หนูจำนวน 8 ตัว

หนูทุกกลุ่ม ใช้หลอด polyethylene ยาว 2 – 3 มิลลิเมตร บรรจุเนยเหลวบริสุทธิ์หรือสารทดลองผสมเนย ฝังในเยื่อหุ้มรังไข่ทั้ง 2 ข้าง ในตอนเช้าของวัน proestrus (10.00 – 12.00 น.) แล้วทำ vaginal smear ตรวจดู cycle ของหนูทุกวัน ฆ่าหนูภายหลังที่กลับมามี cycle ใหม่ แล้วตรวจดูหลอดที่ฝังในเยื่อหุ้มรังไข่ ตัวที่พบหลอดอยู่ในเยื่อหุ้มนี้เท่านั้นจึงจะรวมไว้ในการทดลอง